



PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **10155489 A**(43) Date of publication of application: **16.06.98**

(51) Int. Cl.

C12N 15/09
A61K 39/395
A61K 39/395
C07K 14/705
C07K 16/28
C12P 21/02

(21) Application number: **08331647**(22) Date of filing: **27.11.96**(71) Applicant: **ASAHI CHEM IND CO LTD**
ASAHI MEDICAL CO LTD(72) Inventor: **MIYAMURA KOICHI**
ONO MITSU HARU(54) **RECOMBINANT ANTIBODY AND NUCLEIC ACID
CODING FOR THE SAME****Ser-His-Gly-Val-His**

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject new nucleic acid composed of a nucleic acid which codes for each of CDR-1 to -3 in an antibody H chain variable region having a specific amino acid sequence, for e.g. producing anti-human CD34 antigen antibody, useful for separation of hematopoietic undifferentiated cells, treatment of chronic myelogenous leukemia, or the like.

Val-Ile-Trp-Gly-Ala-Gly-Arg-Thr-Asp-Tyr-As
p-Ala-Ala-Phe-Ile-Ser

SOLUTION: This new nucleic acid has a CDR-1, -2 and -3 in an antibody H chain variable region each with an amino acid sequence shown by the formulas I, II and III, respectively, codes for these amino acid sequences, and can be used e.g. for producing a new anti-human CD34 antibody to be bound to a human CD34 antigen, useful for separation of hematopoietic undifferentiated cells, treatment of chronic myelogenous leukemia by binding the toxin, or the like. The nucleic acid is obtained by the following steps; extraction of mRNA from a hybridoma Anti-My-10 (ATCC HB-8483:) which produces an anti-human CD34 antibody, synthesis of a cDNA using the mRNA as the template, and magnification of the cDNA by the PCR method using DNA, which codes for a partial sequence of the antibody's variable region, as the primer.

Asn- Arg-Tyr-Glu-Ser-Tyr-Phe-Asp-Tyr

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平10-155489

(43)公開日 平成10年(1998) 6月16日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	F I	
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A
A 6 1 K 39/395		A 6 1 K 39/395	A
	A D V		A D V D
C 0 7 K 14/705		C 0 7 K 14/705	
16/28		16/28	
審査請求 未請求 請求項の数 8 F D (全 15 頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願平8-331647	(71)出願人	000000033 旭化成工業株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号
(22)出願日	平成8年(1996)11月27日	(71)出願人	000116806 旭メディカル株式会社 東京都千代田区内幸町1丁目1番1号
		(72)発明者	宮村 耕一 愛知県名古屋市中区東大曾根町上3丁目 1020-2
		(72)発明者	大野 満春 静岡県富士市鮫島2番地の1 旭化成工業 株式会社内
		(74)代理人	弁理士 藤野 清也 (外1名)

(54)【発明の名称】 組換え抗体及びそれをコードする核酸

(57)【要約】

【課題】 H鎖及びL鎖の変換領域の CDRのアミノ酸配列が、新規な抗ヒトCD34抗体、このアミノ酸配列をコードする核酸、この核酸を遺伝子として遺伝子組換え法で抗体を生産する方法、及び抗体と担体からなる医薬組成物。

【解決手段】 配列表配列番号3に示されるアミノ酸配列をコードする核酸。この核酸を遺伝子として用いて遺伝子組換え手続でヒトCD34抗原に結合する抗ヒトCD34抗体を生産する方法及び得られた抗体。この抗体は、血液、細胞懸濁液等から効率よく、造血未分化細胞を分離することができ、毒素を結合させて慢性骨髄性白血病等の治療に用いられる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 抗体のH鎖可変領域のCDR-1、CDR-2及びCDR-3が次のアミノ酸配列をコードする核酸。

CDR-1； Ser-His-Gly-Val-His

CDR-2； Val-Ile-Trp-Gly-Ala-Gly-Arg-Thr-Asp-Tyr-Asp-Ala-Ala-Phe-Ile-Ser

CDR-3； Asn-Arg-Tyr-Glu-Ser-Tyr-Phe-Asp-Tyr

【請求項2】 抗体のL鎖可変領域のCDR-1、CDR-2及びCDR-3が次のアミノ酸配列をコードする核酸。

CDR-1； Arg-Ser-Ser-Gln-Asn-Leu-Val-His-Ser-Asn-Gly-Asn-Thr-Tyr-Leu-His

CDR-2； Lys-Val-Ser-Asn-Arg-Ser-Phe-Gly-Val-Pro-Asp-Arg-Phe

CDR-3； Ser-Gln-Ser-Thr-His-Val-Pro-Leu-Thr

【請求項3】 抗体の(A) H鎖可変領域が配列表配列番号1のアミノ酸3～117位に記載された配列あるいはそれと実質的に同じ機能のアミノ酸配列を含み、(B) L鎖可変領域が配列表配列番号2のアミノ酸3～113位に記載される配列あるいはそれと実質的に同じ機能のアミノ酸配列を含むアミノ酸配列をコードする核酸。

【請求項4】 請求項1～3のいずれかに記載の核酸を用い、遺伝子組換え手法によってヒトCD34抗原に結合する抗体を生産することを特徴とする組換え抗体の生産方法。

【請求項5】 請求項1～3のいずれかに記載の核酸を用い、遺伝子組換え手法によって得ることのできるヒトCD34抗原に結合する組換え抗体。

【請求項6】 Fc領域がヒト型である請求項5記載の組換え抗体。

【請求項7】 一本鎖抗体である請求項5または6記載の組換え抗体。

【請求項8】 請求項5～7のいずれかに記載の組換え抗体と医薬的に許容し得る担体とからなる医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、新規な遺伝子組換え抗体、特に抗ヒトCD34抗体、そのアミノ酸配列をコードする核酸、該抗体の生産方法及び該抗体を含有する医薬組成物に関する。

【0002】

【従来の技術】 従来ヒトCD34は、造血未分化細胞の細胞表面抗原として報告され、そのヒトCD34分子を認識する抗体（以下、抗ヒトCD34抗体という）の産生細胞として抗MY10抗体産生ハイブリドーマが知られている（米国特許第4965204号明細書、及びJ. Immunology誌、133巻、157頁、1984年）。その後、抗ヒトCD34抗体は多数報告され、また、骨髓移植などの医療分野において造血未分化細胞の分離などへの応用が図られている。こうした医療に向けた応用を有効に活用するため抗ヒトCD34抗体を大量に生産する必要が生じてきている。

【0003】 通常の抗体は大小2種類のポリペプチドからなり、その大きい方のサブユニットを「H鎖」といい、小さい方のサブユニットを「L鎖」という。また、それぞれのペプチドは、N末端側に存在して抗原結合部位を形成する「可変領域」（または「V領域」）と、抗体のクラス別に一定の「定常領域」（または「Fc」）とからなっている。可変領域は、更に、特に抗原結合部位の形成に密接に関係している相補性決定領域「CDR」と、その間に介在する枠組領域「フレームワーク」に分けられる。CDRには、H鎖とL鎖のそれぞれについて、N末端側から「CDR-1」「CDR-2」「CDR-3」と呼ばれる3つの領域が存在することが知られている。図1にIgGの構造模式図を示す。

【0004】 CD34抗原は、血液の未分化細胞上に発現する未分化細胞の抗原マーカーとして知られている。この抗原マーカーを利用し、未分化細胞を分離する試みが報告されてきている（S. Saelandら、Blood誌第72巻第1580頁（1988年）など）。さらに、抗CD34抗体と、ビオチンやアビジン、または磁気ビーズとの組み合わせなどを利用し、未分化細胞を、分化した細胞群および癌細胞から分離する医療機器の開発が行われつつある（Dregerら、ExpHematol誌第23巻第147頁（1995年））。

【0005】 造血未分化細胞とは、特定の刺激により増殖可能な細胞であり、赤血球、単球、顆粒球、リンパ球、マクロファージなどの成熟した細胞群を1種類以上に分化しうる細胞を示している。特に、半固形培地にて適当な増殖因子存在下で培養した場合、コロニーを形成する未分化な血液細胞及び、全ての系列への分化能と自己増殖能を有する造血幹細胞を含む。その細胞は、骨髓や臍帯血に豊富に含まれている。また、その細胞は、末梢血中にも含まれるが、顆粒球コロニー形成因子（G-CSF）などのサイトカインを投与することで、末梢血中に誘導することもできる。また、これらの細胞を培養することにより、造血未分化細胞を対外で増殖させる技術も報告されつつある。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】 抗体は、一般に抗原との結合性が強く、かつ特異性が高いことが知られ、医療への利用が期待されている。しかし、医療への応用に際し、抗体の大量生産方法と、その製造に掛かる費用が問題となっている。この問題を解決する方法として、抗体遺伝子を利用した組換え抗体の作成により、無血清生産におけるヒトマウスキメラ抗体生産量の向上、生産費用の低減を可能とした。生体内に存在する通常の抗体は、抗原特異的な可変領域塩基配列及び定常領域遺伝子の2つが必要である。定常領域遺伝子には少数のクラスが知られるが、H鎖L鎖の可変領域塩基配列は極めて多様性が高く、目的とする可変領域塩基配列の取得は非常に労力を要する。しかしながら、本発明者らは、遺伝子増幅（PCR）やフローサイトメーターによる結合実験を駆使す

ることにより、ハイブリドーマ中の複数の抗体遺伝子の中から目的とするヒト CD34 抗原に対する遺伝子を取得するのに成功した。その遺伝子を組み換えてヒトマウスキメラ抗体、1本鎖抗体を大量に生産することを可能にした。

【0007】すなわち、本発明の課題は、可変領域のH鎖及びL鎖が特定のアミノ酸配列をコードする新規な核酸及びこの核酸を遺伝子として用いて遺伝子組換え手法によって得られるヒトCD34抗原と結合する新規な抗ヒトCD34抗体及びその生産方法を提供することにある。さらに本発明の課題は、これらの抗体と医薬的に許容される担体とよりなる新規な医薬組成物を提供することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】すなわち、本発明は、抗体の(1) H鎖可変領域及び/又は(2) L鎖可変領域のCDR-1、CDR-2及びCDR-3が次のアミノ酸配列をコードする核酸に関する。

【0009】(1) H鎖可変領域のCDR-1、CDR-2及びCDR-3のアミノ酸配列；

CDR-1； SHGVH

CDR-2； VIWGAGRTDYNAAFIS

CDR-3； NRYESYFDY

上記は、アミノ酸を1文字略字で表したものであるが、これを3文字略字で示すと次のとおりになる（以下、3文字略字で示す。）

CDR-1； Ser-His-Gly-Val-His

CDR-2； Val-Ile-Trp-Gly-Ala-Gly-Arg-Thr-Asp-Tyr-Asn-Ala-Ala-Phe-Ile-Ser

CDR-3； Asn-Arg-Tyr-Glu-Ser-Tyr-Phe-Asp-Tyr

【0010】(2) L鎖可変領域のCDR-1、CDR-2及びCDR-3のアミノ酸配列；

CDR-1； RSSQNLVHSNGNTYLH,

CDR-2； KVSNRSFGVPDRF,

CDR-3； SQSTHVPLT

上記は、アミノ酸を1文字略字で表したものであるが、これを3文字略字で示すと次のとおりになる（以下、3文字略字で示す。）

CDR-1； Arg-Ser-Ser-Gln-Asn-Leu-Val-His-Ser-Asn-Gly-Asn-Thr-Tyr-Leu-His

CDR-2； Lys-Val-Ser-Asn-Arg-Ser-Phe-Gly-Val-Pro-Asp-Arg-Phe

CDR-3； Ser-Gln-Ser-Thr-His-Val-Pro-Leu-Thr

【0011】また、本発明は、抗体のH鎖可変領域が配列表配列番号1のアミノ酸3～117位に記載された配列あるいはそれと実質的に同じ機能のアミノ酸配列を含み、かつL鎖可変領域が配列表配列番号2のアミノ酸3～113位に記載された配列あるいはそれと実質的に同じ機能のアミノ酸配列を含むアミノ酸配列をコードする核酸に関する。

【0012】さらに、本発明は、H鎖可変領域あるいはL鎖可変領域のCDR-1、CDR-2及びCDR-3が次のアミノ酸配列である抗体をコードする核酸に関する。すなわち、本発明は、H鎖可変領域のCDR-1、CDR-2及びCDR-3が次のアミノ酸配列である抗体をコードする核酸に関する。

CDR-1； Ser-His-Gly-Val-His

CDR-2； Val-Ile-Trp-Gly-Ala-Gly-Arg-Thr-Asp-Tyr-Asp-Ala-Ala-Phe-Ile-Ser

10 CDR-3； Asn-Arg-Tyr-Glu-Ser-Tyr-Phe-Asp-Tyr

【0013】また本発明は、L鎖可変領域のCDR-1、CDR-2及びCDR-3が次のアミノ酸配列である抗体をコードする核酸に関する。

CDR-1； Arg-Ser-Ser-Gln-Asn-Leu-Val-His-Ser-Asn-Gly-Asn-Thr-Tyr-Leu-His

CDR-2； Lys-Val-Ser-Asn-Arg-Ser-Phe-Gly-Val-Pro-Asp-Arg-Phe

CDR-3； Ser-Gln-Ser-Thr-His-Val-Pro-Leu-Thr

【0014】また本発明は、次の(A)～(C)の性質を有する抗体をコードする核酸に関する。

(A) H鎖可変領域が配列表配列番号1のアミノ酸3～117位に記載された配列あるいはそれと実質的に同じ機能のアミノ酸配列を含む、(B) L鎖可変領域が配列表配列番号2のアミノ酸3～113位に記載される配列あるいはそれと実質的に同じ機能のアミノ酸配列を含む、(C) ヒトCD34抗原に結合する。

【0015】さらに、本発明は、前記核酸を用いて遺伝子組換え手法によって産生され、ヒトCD34抗原に結合する性質をもつ組換え抗体に関する。本発明における組換え抗体は、そのFc領域がヒト型であっても、また一本鎖抗体であってもよい。また、本発明は、前記核酸を用いて遺伝子組換え手法でヒトCD34抗原に結合する性質をもつ組換え抗体を製造する方法に関する。またさらに、本発明は、これらの組換え抗体と医薬的に許容される担体とからなる医薬組成物に関する。

【0016】抗MY10抗体のH鎖の可変部位の遺伝子配列及びそれがコードするアミノ酸配列を、配列表配列番号1に示す。配列表配列番号1のアミノ酸1から30位はフレームワーク1を、31から35位はCDR-1を、36から49位はフレームワーク2を、50から65位はCDR-2を、66から97位はフレームワーク3を、98から106位はCDR-3を、107から117位はフレームワーク4をそれぞれ示す。また、抗MY10抗体のL鎖の可変部位の遺伝子配列及びそれがコードするアミノ酸配列を、配列表配列番号2に示す。配列表配列番号2の1から23位はフレームワーク1を、24から39位はCDR-1を、40から54位はフレームワーク2を、55から61位はCDR-2を、62から93位はフレームワーク3を、94から102位はCDR-3を、103から113位はフレームワーク4をそれぞれ示す。

50 【0017】本発明でいう「抗体」とは、通常生体内に

存在する形の抗体の他に、抗体のH鎖もしくはL鎖の可変領域もしくはその組み合わせで形成される抗原結合部位を少なくとも1つ含む分子を含む。例えば、H鎖の可変領域のみ含むペプチド、1組のH鎖とL鎖からなる Fab、2組のH鎖断片とL鎖からなる (Fab')₂、H鎖断片とL鎖が同一ペプチド上に直列に結合した1本鎖抗体「ScFv」なども含まれる。本発明でいう「ヒト CD34 抗原」とは、Civin らにより報告 (米国特許第 4965204号 明細書、及び J. Immunology 誌第 133巻第 157頁 (1984 年)) されている抗原をいう。この抗原は、血液の未分化細胞上に発現する造血未分化細胞の抗原マーカーとして知られている。

【0018】本発明でいう「実質的に同じ機能」とは、抗原分子上のエピトープ、抗原との結合力が実質上同じであることをいう。可変領域のフレームワークや定常領域におけるアミノ酸置換があったとしても、しばしば本質的に同じ性能の抗体を生成することが知られている。抗体の抗原特異性と抗原への結合の強さが、主にCDRのアミノ酸配列によって決定されることはマウス抗体のヒト化で示されている (Gussow, D. and Seemann, G., Methods in Enzymology, 203:99-21 (1991); Glaser, S. M. et al., J. Immunology 149:2607-2614 (1992))。

【0019】さらに、組換え抗体の産生方法として、例えば、COS7細胞により抗体を分泌発現するには、種々のベクターが使用可能であり、(Whittle, N. and Adair, J. et al. (1987), Protein Eng., 1(6), 499-505.; Sutter, K.D. and Feys, V. et al. (1992), Gene 113, 223-30.)、例えばヒト抗体の発現プラスミド (pG1) を利用し、ヒト・マウスキメラ抗ヒト CD34 抗体を発現し得るプラスミド pG1My10を作成し、これをCOS7細胞へ遺伝子導入し、ヒト抗 CD34 抗体の生産を行う。ここで言う、ヒト・マウスキメラ抗体とは、可変領域がハイブリドマ由来のマウス遺伝子配列であり、定常領域がヒト由来の遺伝子配列から構成される遺伝子によって生産された抗体を示す。発現プラスミド pG1は、国際公開公表番号 W095/15393号公報に記載の pSEプラスミドのヒト C γ 1 の配列に付加されている膜通過ドメイン(TM)を除去して、通常の抗体の様に生体内に分泌されるように改良したプラスミドである。その作成の詳細は、参考例として記してある。つまり、ヒト定常領域をコードする遺伝子配列を有しており、マウス可変領域遺伝子をつなぐことにより、ヒトマウスキメラ抗体を発現しうるプラスミドである。

【0020】COS7細胞は、通常10%ウシ胎児血清加 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM 培地) を用い、5%CO₂ 存在下37℃で培養する。COS7細胞への遺伝子導入法や遺伝子導入後の細胞の育種生産法は、バイオマニュアルシリーズ4「遺伝子導入と発現・解析法」; 横田 崇、新井 賢一 羊土社(1994)等の実験書に記載されている。COS7細胞への遺伝子導入法は、電気穿孔法

の他、DEAEデキストラン法 (Bebbington, C.R. (1991); METHODS: A Companion to Methods in Enzymology, 2(2), 136-45.) であっても良い。

【0021】本発明の実施例によれば、発現プラスミド pG1 に組み込まれた定常領域遺伝子が C γ 1 であるため、各クローンは IgG1 として発現する。抗体の生産時には、血清由来のウシ抗体の混入を避けるために、無血清のDMEM培地によって培養することが望ましい。こうして培養上清中に分泌された抗 CD34 抗体は、例えばプロテインAやプロテインGを用いる一般的な IgG抗体の精製法によって容易に精製することができる。工業生産の場合の宿主としては CHO細胞、ミエローマSp2/0細胞がよく知られている (Xiang, J. et al. (1990) Mol. Immunol., 27, 809; Bebbington, C.R. et al. (1992) Bio/technology, 10, 169; Larrick, J.W. and Wallace, E.F. et al. (1992) Immunol. Rev. 130, 69-85.; Deyev, S.M. and Lieber, A. et al. (1994) Appl. Biochem. Biotechnol. 47(2-3), 143-54.)。例えば CHO細胞では、MTX 等の薬剤により生産性の高いクローンを選択する方法も報告されており (Bebbington, C.R. (1991) METHODS: A Companion to Methods in Enzymology, 2(2), 136-45.)、安定な高生産株が取得できれば、その株を組換え抗ヒト CD34 抗体の工業的生産に利用できる。

【0022】また、本発明の1本鎖抗体は、pCANTAB5E プラスミド (ファルマシア社) を利用することにより調製し得る。H鎖及びL鎖に結合するリンカーは、本プラスミドに含まれるが、本配列に限定されずに利用することができる。ハイブリドマから1本鎖抗体を単離する方法は、Recombinant Phage Antibody System キット (ファルマシア社) などを利用することが可能な場合もあるが、本発明のようにスクリーニングに必要なヒト CD34 抗原が無い場合、キットを有効に使用できず多くの工夫を要する。

【0023】抗体の形状として、生産された抗体分子をそのまま利用することも可能であるが、各種プロテアーゼ処理により得られる抗原結合部位を含む断片である Fab、F(ab')₂、Fv あるいは Fd など適用することができる。これらの断片については、「抗体工学入門」第20~22頁 (平成6年1月25日地人書館発行金光ら著) などに説明がされている。その他にも本発明をヒト体内の血液を体外循環に応用する場合には抗体が血液中に遊離した際の副作用、抗原性などを考慮して可変領域以外の部分をヒト型抗体にするようなキメラ抗体を用いることも有用である。これら抗体の作製方法は特に限定されるものではないが、高純度に精製されたものを用いなければならない。モノクローナル抗体の生産方法は、通常行なわれているハイブリドマをマウスの腹腔で増殖させ腹水から生産された抗体を回収する方法、もしくは、無血清培地による培養上清から得る方法でよい。断片ペプチドの場合には抗体分子の酵素処理により得ることがで

きるが、遺伝子工学的な手法により細菌、酵母などに産生させることも可能である。これらの方法により得たモノクローナル抗体、モノクローナル抗体由来抗体断片、ペプチド等を組み合わせることにより、より強固な結合性を生じる。

【0024】さらに本発明の遺伝子によって生産させた抗体に毒素を結合させ、慢性骨髄性白血病などの患者に投与し、急増したCD34陽性白血病細胞を低減させることができる。また、こうした修飾抗体は、体外に取り出した患者の骨髓液、もしくはアフエーシスにより回収した患者の末梢血白血球懸濁液にも利用することができる。また、他の抗体由来の可変領域の遺伝子を組み合わせることにより、バイスペシフィック抗体、マルチスペシフィック抗体の生産も可能となる。マルチスペシフィックとは、異なる抗原もしくはエピトープを認識する抗原結合部位を少なくとも2種類以上有する抗体を示す。中でもバイスペシフィックとは、異なる抗原もしくはエピトープを認識する抗原結合部位を2種類以上有する抗体を示す。例えば、通常の抗体の一方の抗原結合部位がCD34抗原を認識し、もう一方の抗原結合部位をリンパ球抗原CD3等に対するバイスペシフィック化したもので、CD34陽性白血病細胞にリンパ球をより強く認識させ抗白血病効果を誘導することができる。CD3以外にも、汎リンパ球マーカー、例えばCD2、CD4、CD5、CD6、CD7などが利用することができる。これらを組み合わせ、IgMとして発現させれば、バイスペシフィック、マルチスペシフィックの抗体を作成し得る。こうした生産時にバイスペシフィック化する以外に、モノクローナル抗体を生産、精製し、その後抗体同士を結合させ、バイスペシフィック化、マルチスペシフィック化することができる。

【0025】これらは、異なる抗原に対してのみならず、同一分子内の異なるエピトープ、例えば異なる抗CD34抗体を組み合わせることも可能である。抗CD34抗体は、いくつか報告されている。例えば抗HPCA-2抗体(ベクトンデッキンソン社)、抗HPCA-1抗体(ベクトンデッキンソン社)、4A1(ニチレイ社)、B1.3C5(Katzら、Leuk. Res. 誌、9巻、191頁、1985年)、12.8、115.2(Andrewsら、Blood誌、67巻、842頁、1986年)、I CH3(Wattら、Leukaemia誌、1巻、417頁、1987年)、Tuk3(Unchanska-Zieglerら、Tissue Antigens、33巻、230頁、1989年)、QBEND10(Finaら、Blood、75巻、2417頁、1990年)、CD34(Ab-1)(Oncogene Sciences社)、Immu-133(Barrandeら、Hybridoma誌、12巻、203頁、1993年)などが知られ、これらの抗体遺伝子を単離し、生産に用いることができる。

【0026】1本鎖抗体のアミノ酸配列は、配列表配列番号3に示した。それをコードする核酸配列の例をアミノ酸配列と共に示した。配列表配列番号3のアミノ酸配列の1から29位は大腸菌からの分泌用シグナルを含む配

列を、30から146位はH鎖の可変領域を、147から164位はリンカーを、165から274位はL鎖の可変領域を、275から292位まではE-tagを含む配列をそれぞれ示す。pCANTAB5Eプラスミド(ファルマシア社)は、リンカーとしてH鎖及びL鎖の一部を含む配列、つまり140から169位が用意されており、本発明ではその配列を利用して上記配列を作成することができる。

【0027】1本鎖抗体の場合においても、毒素を結合させる。また、生産時でのバイスペシフィック化、マルチスペシフィック化が可能であり、1ペプチド内に複数の抗原認識部位の組み合わせのH鎖及びL鎖を繰り返して並べることにより生産させることができる。また、生産、精製後に結合させることもできる。H鎖及びL鎖の組み合わせによらず、H鎖のみもしくはL鎖のみのペプチドを利用することもできる。こうした抗体種の選択は、利用する用途により行うことができ、結合強度、抗原性等で選択し得る。

【0028】さらにまた本発明は、上記記載の本発明のモノクローナル抗体と医薬的に許容しうる担体とからなる医薬組成物を提供する。例えば医薬的に許容しうる成分組成の担体や安定化剤など、人体への投与に際し、該抗体の活性を保持させるために使用される物質とともに医薬用組成物中に含まれていてもよい。このような担体や安定化剤としては、ヒト血清アルブミン、ゼラチン等を例示することができる。医薬的に許容しうるとは、悪心、目眩、吐き気等投与に伴う望ましくない副作用、頻回投与時の製剤に対する免疫応答などが起きないことを意味する。また、医薬的に許容しうる適当な溶剤や希釈剤、安定化剤とともに溶解された液状の医薬用組成物でもよい。さらに上記の医薬組成物に加えて生体内における濃度調節を目的とするミクロスフィア、リポソーム等の徐放移植体を含む医薬用組成物であってもよい。本発明において非経口(注射)する場合は、キメラ抗体及びScFvで10 μ g \sim 1mg/体重kg程度が適当である。また、体外で細胞を処理する場合は、0.1 μ g \sim 1mg/ml程度が適当である。

【0029】

【発明の実施の形態】以下、本発明の参考例及び実施例を説明するが、これらは本発明を具体例に説明するものであって、本発明を限定するものではない。

【参考例】pG1プラスミドの調製を行った。膜結合型ヒト抗体の発現ベクターpSE(国際公開公表番号W095/15393号公報)の膜貫通領域(TM)を除去し、ヒト抗体を分泌発現可能なベクターを作製した。まず発現ベクターpSEを制限酵素SalIで消化後、切断末端を平滑化した。この反応は、DNA Blunting Kit(宝酒造社)を用い、添付のプロトコールに従って操作した。以上の処理を行った発現ベクターpSEを制限酵素ApaIで消化後、0.7%アガロースゲルにて電気泳動し、C γ 1遺伝子及び膜貫通領域(TM)を含む遺伝子領域が欠失したpSEベクター

DNAを抽出精製した。この反応は GeneCleanII Kit(フナコシ社)を用い、添付のプロトコールに従って操作した。抽出した pSEベクターの制限酵素切断末端は、ウシアルカリフォスファターゼ(宝酒造社)により、自己環化が起きないように処理した。次に、ヒト C γ 1 遺伝子の全長が組み込まれたプラスミド DNA pUCCG1 を制限酵素 KpnI(宝酒造社)で消化し、切断末端を平滑末端化した後、制限酵素 ApaI で消化した。この反応物を 0.7% アガロースゲルにて電気泳動し、C γ 1 遺伝子の全長を含む DNA断片を抽出精製した。この DNA断片と、先の処理を行った発現ベクター pSE とをライゲーションキット Ver. 2 (宝酒造社)を用いて連結し、連結反応産物を大腸菌 DH5株へ導入した。出現したコロニーから数個を選んで培養し、常法に従ってプラスミド DNAを抽出精製した。発現ベクター pSE に存在する適当な制限酵素を用いてこれらプラスミドの切断パターンを調べ、予想されたパターンに一致したものを選び出した。以上の操作によって得られたプラスミドを pG1とした。図2に pG1プラスミドの概略図を示した。

【0030】

【実施例1】抗体遺伝子を単離するためハイブリドーマ Anti-My-10 (ATCC HB-8483)を、10%牛胎児血清(Flow社)を添加したRPMI-1640 培地(Gibco社)で培養した。あらかじめハイブリドーマは、限外希釈法で、クローンを分離し、培養上清を測定しKG-Ia 細胞(ATCC CCL-246.1)(CD34 抗原陽性急性骨髄白血病細胞で造血未分化細胞の形態、性状を示す。)への結合性の高いクローンを選択した。この細胞6x10⁷から全 RNAを AGPC 法(Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-PhOH-chloroform extraction. Anal. Biochem. 162, 156-159.)で分離した。さらに、分離した RNAから mRNAを QuickPrep mRNA Purification Kit(ファルマシア社)を使用し単離した。得られた mRNA を鋳型として、1st strand cDNA を合成した。これは、cDNASynthesis Kit (ファルマシア社)を使用し、添付の説明書に従い行った。その後、PCR 法により、目的の遺伝子の増幅を行った。プライマーは、マウス抗体遺伝子 cDNA が合成しうる配列候補を Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th edition, 1991(USA NIH 発行)に掲載されたマウス抗体可変領域の遺伝子配列を参考にして複数合成し、それらプライマーを組み合わせた PCR法を行った。

【0031】H鎖の取得に関し核酸配列(5' GTCCAGGA TCCTCTGAAGCAGTCAGGCC3')及び(5' ACAGTGGGCCGTCGTTT TGGCTGAGGAGA3')を、L鎖の取得に関し(5' TGTGCCCTCG AGGTGACTCAA ACTCCACTCTC3')及び(5' ATGATACTAGTGGT CAGCATCAGCCC3')の配列を持つプライマーから遺伝子が増幅された。増幅された遺伝子断片は、TA cloning kit (インビトロジェン社)を使用し、クローニングした。

これら得られた遺伝子のH鎖及びL鎖の可変領域塩基配列を決定した。塩基配列の決定はcDNAシーケンサー Ver.1.2.0, Model373 A(Applied Biosystems社)を用い、メーカーのプロトコールに従って行った。

【0032】標識反応は、H鎖はSer-Glu-Gln-His-Cys(すなわち、1文字略字で示すと、SEQHC)(5' CTCTTGAGG AGGGTGCCAG3')を、 κ 鎖はSer-Glu-Gln-Leu-Cys(すなわち、1文字略字で示すと、SEQLC)(5' CCAGATTCAACTGCTC ATCAGA3')をプライマーとして、PRISM Ready Reaction DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems社)を用い、方法は添付のプロトコールに従った。

【0033】染色は、ABI社のラベリングキットを利用した。その結果、H鎖のプライマーから得られた遺伝子断片を配列表配列番号1、L鎖のプライマーから得られた遺伝子断片を配列表の配列番号2に示した。

【0034】

【実施例2】実施例1で得られた抗 CD34 抗体のH鎖及びL鎖可変領域塩基配列を含む遺伝子断片を pG1プラスミド(約7kb)へ組み込み、抗 CD34 抗体を発現可能なプラスミドを作製した。クローンのプラスミド DNAのL鎖を制限酵素XhoI(宝酒造社)及びSpeI(宝酒造社)で消化後、0.7%アガロース電気泳動ゲルにて展開し、L鎖可変領域塩基配列を含む DNA断片を切り出し抽出した。アガロースゲルからのDNA断片の抽出には、GeneCleanII Kit(フナコシ社)を用い、添付のプロトコールに従って操作を行った。次に、ベクター pG1 を制限酵素XhoI及びSpeIで消化後、0.7%アガロースゲルにて同様に切り出し抽出したものと連結した。次にクローンのプラスミド DNAのH鎖可変領域塩基配列を含む DNA断片を制限酵素ApaI(宝酒造社)及びBamHI(宝酒造社)で切り出し抽出した。アガロース電気泳動ゲルからの DNA断片の抽出には、GeneCleanII Kit(フナコシ社)を用い、添付のプロトコールに従って操作を行った。次に、上記でH鎖可変領域塩基配列を含む DNA断片が挿入されたベクター pG1を制限酵素 ApaI 及び BamHIで消化後、0.7%アガロース電気泳動ゲルから同様に切り出し抽出したものと連結し、連結反応物を大腸菌JM109株へ導入した。この連結反応には、ライゲーションキットver.2(宝酒造社)を用いた。形質転換した大腸菌をアンピシリン含有LBプレートに蒔いて一晚培養し、出現したコロニーの中から数個を選び、常法に従ってプラスミド DNAを抽出精製した。これらを組み込みに用いた制限酵素 XhoI 及び ApaI にて消化し、H鎖及びL鎖可変領域塩基配列を含む断片が挿入されたものを選び出した。以上の方法にて得られた分泌型抗体発現プラスミドを pG1MY10(約7.7kb)とした。

【0035】

【実施例3】実施例2にて得られた分泌型抗体発現プラスミド pG1MY 10を、DEAEデキストラン法(Beb-bing

ton, C. R. (1991); METHODS: A Companion to Methods in Enzymology, 2(2), 136-145.)にてそれぞれ COS7 細胞へ導入した。COS7 細胞を10%ウシ胎児血清(FCS) 加 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM)にて、遺伝子組み込みの4日前に直径100mm のディッシュあたり約 6.1×10^6 Cells/10ml となるよう蒔き直し、培養した。4日後、まず上清を除き、PBS(-)にて細胞を静かに洗浄して、4ml の10% FCS加 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) を加え、次いで DEAE デキストラン/分泌型抗体発現プラスミド混合液を細胞へ均一にふりかけて、37℃で4時間インキュベートした。この混合液は 20mg/ml の DEAE デキストラン (ファルマシア社 Code No. 170350-01, Lot. PF97323) 水溶液と、分泌型抗体プラスミドを TBS(-) (20mM Tris · HCl (pH7.4), 0.15M NaCl) により $0.17 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ とした溶液を 2:1 (v/v) で混合したものであり、ディッシュあたり $180 \mu\text{l}$ を添加した。インキュベーション後、上清を捨て、10%ジメチルスルフォキシド(DMSO)添加 PBS(-) 5ml を加えて1分静置した。次いで上清を捨て、PBS(-)で洗浄後、 $100 \mu\text{M}$ クロロキン(Sigma No-6628)入りの2% FCS 添加 DMEM 7ml を加え、37℃で3時間インキュベートした。その後、上清を捨て、PBS(-)で洗浄して、10% FCS 加 DMEM 10ml を加え、培養した。翌日、PBS(-) 及び DMEM にて FCS 加 DMEM をよく除去した後、無血清の DMEM 10ml を加え、生産を開始した。

【0036】生産開始から3日後培養上清を回収し、以後約2週間生産を続けた。得られた培養上清を集め、プロテインGセファロースカラムクロマトグラフィーにより精製し、これをヒトマウスキメラ抗 CD34 抗体の精製標品とした。精製標品の CD34 抗原への結合は次の方法により確認した。1.5ml チューブに培養細胞 KG1a を 1×10^6 個調製し、細胞懸濁液(2% FCS 添加 PBS(-))で2回洗浄した。洗浄した細胞に細胞懸濁液を $50 \mu\text{l}$ 添加し懸濁した。これに精製標品を $1 \mu\text{g}$ 加え、水中で30分間静置した。その後さらに細胞懸濁液で3回洗浄を行った後、細胞懸濁液を $50 \mu\text{l}$ 添加し懸濁した。これに FITC 標識ヤギ抗ヒト IgG (Fc) 抗体(1/20 希釈 Immunotec 社)を $1 \mu\text{g}$ 加え水中で30分間静置した。その後さらに細胞懸濁液で3回洗浄を行った後、細胞懸濁液を $300 \mu\text{l}$ 添加し懸濁した。以上の処理を行った細胞にフローサイトメーター(ベクトンディッキンソン社)でレーザー光を照射することにより細胞上に結合した抗体量を蛍光にて測定した。対照として、精製標品の代わりにミエローマ由来ヒト IgG 抗体を $1 \mu\text{g}$ 加え、同様の操作で細胞を処理した。図3に、精製標品の CD34 抗原への結合を示した。図3(1)は通常のマウス抗原を使用した場合、(2)は本精製標品を使用した場合であり、ネガティブコントロールである白ピークに対し、それぞれの抗体が結合することにより黒ピークの移動が認められた。この結果、抗 CD34 抗体 pG1MY10由来の精製標品は CD34 抗原

への結合活性を保持していることが確認され、実施例1記載の特徴を有するヒトマウスキメラ抗体には CD34 抗原に対する結合活性があることが実証された。また、本精製標品によって、CD34陽性細胞を検出しうることを確認した。

【0037】

【実施例4】抗体遺伝子を ScFv 抗体産生用ベクターに組み込むため、実施例2で得た遺伝子を制限酵素配列を含むプライマーを使用し、PCR法で増幅させた。H鎖用プライマーの核酸配列は、(5' GCGGCCAGCCGCCATGCCAGGTGCAGCTGAAGCAGTCAG3') 及び (5' AGACGGTGACCGTGTGCCTTGGCCCC3')、L鎖用プライマーの核酸配列は、(5' TCGAGCTCACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCT3')、及び (5' CACTCGCGCCGCCGTTTCAGCTC3') を使用した。PCR条件はGeneAmp PCR Reagent Kit with AmpliTaq DNA Polymerase (宝酒造社)を用い、94℃1分、55℃1分、72℃2分を1サイクルとして、30サイクル行った。PCR装置は、型名 DNA Thermal Cycler480 (パーキンエルマー社)を使用した。この増幅した遺伝子をH鎖は制限酵素SfiI (東洋紡社) 及び BstPI (宝酒造社) で消化し、L鎖は制限酵素SacI (宝酒造社) 及び NotI (宝酒造社) で消化した後、1.5%アガロースゲルにて電気泳動し各々の DNA断片を切り出し抽出した。アガロースゲルからの DNA断片の抽出には、Gene CleanII Kit (フナコシ社)を用いて行った。

【0038】ScFv抗体を産生するベクターは、抗 CD34 抗体遺伝子を導入する前にあらかじめ任意の抗体遺伝子を産生するプラスミドの作成を行った。Recombinant PhageAntibody Systemキット (ファルマシア社)を用いて、抗体を産生するハイブリドーマの任意の遺伝子を組み込んだ。そのベクターの作成方法は、このキットに添付された説明書に従った。この任意の抗体遺伝子を含むプラスミドを、制限酵素SacI (宝酒造社) 及びNotI (宝酒造社) で消化後 0.8%アガロースゲルにて電気泳動し、L鎖領域が欠失したベクター DNA断片を抽出精製した。この DNA断片と、先に調製した抗 CD34抗体のL鎖遺伝子を連結してL鎖遺伝子を組み入れた。次に、L鎖が入れ替わったプラスミドを制限酵素SfiI (東洋紡社) 及び、BstPI (宝酒造社) で消化後0.8%アガロースゲルにて電気泳動し、H鎖領域が欠失したベクター DNA断片を抽出精製した。この DNA断片と、先に調製した抗 CD34 抗体のH鎖遺伝子を連結してH鎖遺伝子を組み入れた。各々のライゲーションは、ライゲーションVer. 2 キット (宝酒造社) を使用した。またアガロースゲルからの DNA断片の抽出には、Gene CleanII Kit (フナコシ社)を用いて行った。以上の操作によって得られたプラスミドを大腸菌HB2151 (ファルマシア社)へ導入した。形質転換した大腸菌をアンピシリン含有2% Glucose加 2xYT プレートに蒔いて一晚培養し、出現したコロニーの中から数個を選び、常法に従ってプラスミドDN

Aを抽出精製した。適当な制限酵素を用いてこれらプラスミドの切断パターンを調べ、予想されたパターンに一致したものを選び出した。以上の操作によって得られた、抗CD34抗体の配列を有すScFv抗体を発現するプラスミドをpCANMY10とした。

【0039】上記プラスミドでトランスフォームした大腸菌を2%グルコース添加100 μ g/mlアンピシリン添加SB培地(3.5%バクトトリプトン、2%バクトイーストエキストラクト、0.5%NaCl)にて培養した。翌日この一部を10倍量の上記培地に加え、1時間培養した後上清を除き、1mMのIPTG、100 μ g/mlアンピシリン添加SB培地の等量に換えて、さらに3時間培養した後、菌体をRPAS PurificationModule(ファルマシア社)のプロトコールに従って処理することにより、ペリプラズム中の抗体を回収した。得られた抗体粗画分をEtag抗体カラム(ファルマシア社)で精製した。このカラムによる精製は添付のプロトコールに従い、付属の試薬を利用して行った。以上の操作によりScFv抗体精製標品を得た。

【0040】

【実施例5】実施例4にて得た抗CD34 ScFv抗体精製標品を使用し、ヒトCD34抗原の検出を行った。1x10⁷個のKG-1a細胞を0.05% Triton X100(ナカライテスク社)を含む1mlのPBS(-)で氷上10分間処理して、細胞膜からのタンパク質抽出を行った。使用したKG-1a細胞は、10%牛胎児血清を含むRPMI-1640培地で培養した。抽出液10 μ lをメルカプトエタノール存在下で、3分間沸騰処理した。この液をSDSポリアクリルアミド電気泳動ゲル(ACI社)を使用し展開した。この電気泳動は、ゲルに添付の説明書に記載の条件で行った。泳動後ゲル中のタンパク質をPVDF膜(BioRad社)にトランスファーした。トランスファーは、25mMトリス192mMグリシンバッファー及びElectrophoresis power Supply-EPS 600装置(ファルマシア社)を使用し、100V、1時間でトランスファーした。フィルターは室温で10%スキムミルク入りPBS(-)にて1時間ブロッキングした。このフィルターは、0.05% Tween-20を含むPBS(-)で洗浄後、15 μ g/mlの一本鎖抗体で1時間反応させた。次に、このフィルターを洗浄後、2次抗体として抗Etag抗体(ファルマシア社)を5 μ g/mlで1時間反応させた。さらに、洗浄後、3次抗体として、パーオキシダーゼ標識抗マウスFc抗体を5 μ g/mlで1時間反応させた。このフィルターを洗浄後、1次抗体の結合した電気泳動のバンドは、ECL液(アマシャム社)で発光させ、高感度フィルム(Hyperfilm-ECL:アマシャム社)で検出した。その結果、ポジティブコントロールと同様約120Kダルトンの位置にCD34分子のバンドが検出された。ポジティブコントロールは、抗HPCA-1抗体(ベクトンディッキンソン社)を1次抗体、パーオキシダーゼ標識抗マウスFc抗体を2次抗体としたフィルターを同様に発色させた。また、ネガティブコントロールとして1次抗体であ

る1本鎖抗体のみを除いて、同様な処理を行った。120Kダルトンのバンドは、検出できなかった。従って、抗CD34一本鎖抗体は、CD34分子を検出していることを確認した。

【0041】

【実施例6】安定なヒトマウスキメラ抗CD34抗体含有製剤を製造した。実施例3で得たヒトマウスキメラ抗体をゲルろ過により100mM塩化ナトリウムを含む20mMリン酸緩衝液、pH7.4(PBS)に無菌的に置換し、そのヒトマウスキメラ抗体1mgとヒト血清アルブミン20mgをPBSに混合し2mlとし、ガラスバイアル瓶に無菌的に注入し密栓した。

【0042】

【実施例7】安定な1本鎖抗CD34抗体含有製剤を製造した。実施例4で得た1本鎖抗体をゲルろ過により100mM塩化ナトリウムを含む20mMリン酸緩衝液、pH7.4(PBS)に無菌的に置換し、その1本鎖抗体500 μ gとヒト血清アルブミン200mgをPBSに混合し2mlとし、ガラスバイアル瓶に無菌的に注入し密栓した。

【0043】

【発明の効果】本発明の抗CD34抗体遺伝子は、効率的に抗CD34抗体を生産することを可能とし、種々の形態の薬剤組成物(治療用型剤)を提供することができる。本発明によれば、人体投与に際して安全性が高い抗ヒトCD34抗原を認識する抗体を大量に調製することを可能とし、造血未分化細胞の分離用リガンド、白血病用抗体製剤が提供可能となる。また、本発明で生産した抗体を利用し、造血未分化細胞の分離を行うことができる。本発明で生産した抗体により、体外において血液細胞懸濁液からあるいは体外循環により血液から効率よく造血未分化細胞を分離することが可能となり、分離した細胞は種々の疾患の治療に用いることができる。本発明における細胞懸濁液には、前述したような最近報告されつつある造血未分化細胞を含む種々の細胞懸濁液が造血未分化細胞を分離する材料となり得る。さらに、本発明のヒトマウスキメラ抗体によれば、医薬品として利用した場合、ヒト体内での抗原性がマウス抗体にくらべ極度に低下しており、より安全性が向上している。通常の抗体をペプシンなどのプロテアーゼで分解したF(ab')₂化した場合でもヒトFcを利用した断片は、マウスのものにくらべ安全性が高い。また、医療機器への応用に際しても、リガンドとして利用されている抗体がプロテアーゼ等の分解を受け微量に遊離してくる可能性があるが、そうした分解産物に関してもヒト化されたものは、安全性が高いといえる。またさらに、本発明の1本鎖抗体によれば、低分子化することにより抗原性を低下させ得る効果が期待される。抗体をパパイニンなどのプロテアーゼ処理しFab化した抗体は、マウスの定常領域を依然として含むが、1本鎖抗体はそれらを除いたものであり、抗原性を非常に低くすることができ得る。

【0044】

【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 351

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

* トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA,

起源

生物名: マウス

株名: anti-My-10

*

配列

CAG GTG CAG CTG AAG CAG TCA GGA CCT GGC CTA GTG CAG CCC TCA CAG	48
Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln	
5 10 15	
AGC CTG TCC TTC ATC TGC ACA GTC TCT GGT TTC TCA TTA ACT AGT CAT	96
Ser Leu Ser Phe Ile Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser His	
20 25 30	
GGT GTA CAC TGG GTT CGC CAG TCT CCA GGA AAG GGT CTG GAG TGG CTG	144
Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu	
35 40 45	
GGA GTG ATA TGG GGT GCT GGA AGG ACA GAC TAT AAT GCA GCT TTC ATA	192
Gly Val Ile Trp Gly Ala Gly Arg Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Ile	
50 55 60	
TCC AGA CTG AGC ATC AGC AGG GAC ATT TCC AAG AGC CAA GTT TTC TTT	240
Ser Arg Leu Ser Ile Ser Arg Asp Ile Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe	
65 70 75 80	
AAG ATG AAC AGT CTG CAA GTT GAT GAC ACA GCC ATA TAT TAC TGT GCC	288
Lys Met Asn Ser Leu Gln Val Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala	
85 90 95	
AGA AAT AGG TAC GAG AGC TAC TTT GAC TAC TGG GGC CAA GGC ACC ACT	336
Arg Asn Arg Tyr Glu Ser Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr	
100 105 110	
TCC CTC ACA GTC TCC	351
Leu Thr Val Ser Ser	
115	

【0045】配列番号: 2

配列の長さ: 339

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

※配列の種類: cDNA

起源

生物名: マウス

株名: anti-My-10

※

配列

GAT GTT GTG ATG ACC CAA ACT CCA CTC TCC CTG CCT GTC AGT CTT GGA	48
Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly	
5 10 15	
GAT CAG GCC TCC ATC TCT TGC AGA TCT AGT CAG AAC CTT GTA CAC AGT	96
Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Leu Val His Ser	
20 25 30	
AAT GGA AAT ACC TAT TTA CAT TGG TAC CTG CAG AAG CCA GGC CAG TCT	144
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser	
35 40 45	
CCA AAT CTC CTG ATC TAC AAA GTT TCC AAC CGA TTT TCT GGG GTC CCA	192
Pro Asn Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro	
50 55 60	
GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGA TCA GGGACA GAA TTC ACA CTC AAG ATC	240

17 18
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 AGC AGA GTG GAG GCT GAG GAT CTG GGA GTT TAT TTC TGC TCT CAA AGT 288
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
 85 90 95
 ACA CAT GTT CCG CTC ACG TTC GGT GCT GGG ACC AAG GTG GAG CTG AAA 336
 Thr His Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Val Glu Leu Lys
 100 105 110
 CGG 339
 Arg

【0046】配列番号：3

配列の長さ：879

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

* 配列の種類：cDNA

起源

生物名：マウス

株名：anti-My-10

*

配列

TTT TTT TTG GAG ATT TTC AAC GTG AAA AAA TTA TTA TTC GCA ATT CCT 48
 Phe Phe Leu Glu Ile Phe Asn Val Lys Lys Leu Leu Phe Ala Ile Pro
 5 10 15
 TTA GTT GTT CCT TTC TAT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG GTG AAG 96
 Leu Val Val Pro Phe Tyr Ala Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val Lys
 20 25 30
 CTG CAG CAG TCT GGA CCT GGC CTA GTG CAG CCC TCA CAG AGC CTG TCC 144
 Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln Ser Leu Ser
 35 40 45
 TTC ATC TGC ACA GTC TCT GGT TTC TCA TTA ACT AGT CAT GGT GTA CAC 192
 Phe Ile Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser His Gly Val His
 50 55 60
 TGG GTT CGC CAG TCT CCA GGA AAG GGT CTG GAG TGG CTG GGA GTG ATA 240
 Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile
 65 70 75 80
 TGG GGT GCT GGA AGG ACA GAC TAT AAT GCA GCT TTC ATA TCC AGA CTG 288
 Trp Gly Ala Gly Arg Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Ile Ser Arg Leu
 85 90 95
 AGC ATC AGC AGG GAC ATT TCC AAG AGC CAA GTT TTC TTT AAG ATG AAC 336
 Ser Ile Ser Arg Asp Ile Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe Lys Met Asn
 100 105 110
 AGT CTG CAA GTT GAT GAC ACA GCC ATA TAT TAC TGT GCC AGA AAT AGG 384
 Ser Leu Gln Val Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Arg
 115 120 125
 TAC GAG AGC TAC TTT GAC TAC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC 432
 Tyr Glu Ser Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
 130 135 140
 TCC TCA GGT GGA GGC GGT TCA GGC GGA GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA 480
 Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 145 150 155 160
 TCG GAC ATC GAG CTC ACT CAG TCT CCA CTC TCC CTG CCT GTC AGT CTT 528
 Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu
 165 170 175
 GGA GAT CAG GCC TCC ATC TCT TGC AGA50CT AGT CAG AAC CTT GTA CAC 576

19
Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Leu Val His
180 185 190
AGT AAT GGA AAT ACC TAT TTA CAT TGG TAC CTG CAG AAG CCA GGC CAG 624
Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
195 200 205
TCT CCA AAT CTC CTG ATC TAC AAA GTT TCC AAC CGA TTT TCT GGG GTC 672
Ser Pro Asn Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val
210 215 220
CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGA TCA GGG ACA GAA TTC ACA CTC AAG 720
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Lys
225 230 235 240
ATC AGC AGA GTG GAG GCT GAG GAT CTG GGA GTT TAT TTC TGC TCT CAA 768
Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln
245 250 255
AGT ACA CAT GTT CCG CTC ACG TTC GGT GCT GGG ACC AAG GTG GAG CTG 816
Ser Thr His Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Val Glu Leu
260 265 270
AAA CGG GCG GCC GCA GGT GCG CCG GTG CCG TAT CCG GAT CCG CTG GAA 864
Lys Arg Ala Ala Ala Gly Ala Pro Val Pro Tyr Pro Asp Pro Leu Glu
275 280 285
CCG CGT GCC GCA TAG 879
Pro Arg Ala Ala *
290

【図面の簡単な説明】

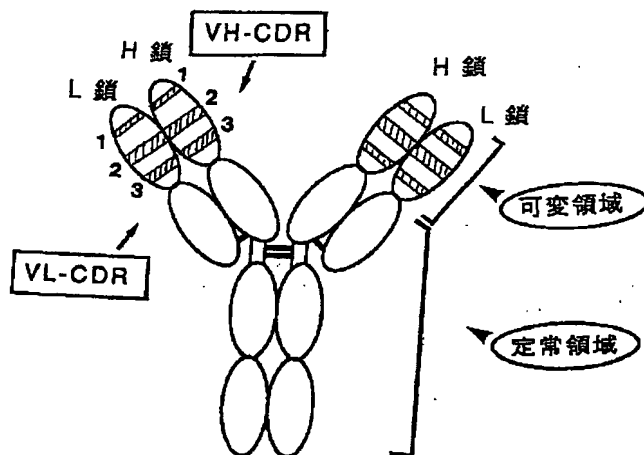
【図 1】 IgG の構造を模式的に示す。

【図 2】 pG1 プラスミドの概略図を示す。

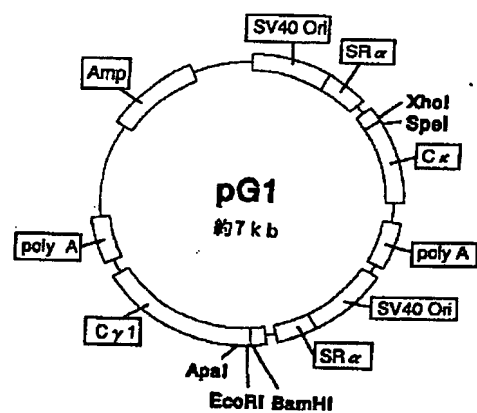
* 【図 3】 本発明のキメラ抗体の KG-Ia細胞への結合性を示す。

*

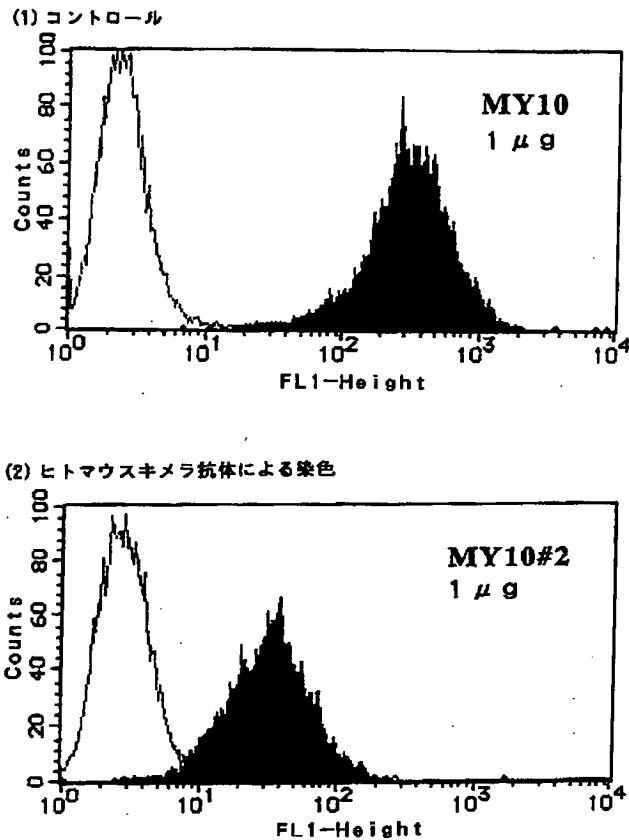
【図 1】



【図 2】



【図3】



【手続補正書】

【提出日】平成9年4月3日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】請求項1

【補正方法】変更

【補正内容】

【請求項1】 抗体のH鎖可変領域のCDR-1、CDR-2及びCDR-3が次のアミノ酸配列をコードする核酸。

CDR-1 ; Ser-His-Gly-Val-His

CDR-2 ; Val-Ile-Trp-Gly-Ala-Gly-Arg-Thr-Asp-Tyr-Asn-Ala-Ala-Phe-Ile-Ser

CDR-3 ; Asn- Arg-Tyr-Glu-Ser-Tyr-Phe-Asp-Tyr

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0012

【補正方法】変更

【補正内容】

【0012】さらに、本発明は、H鎖可変領域あるいは

CDR-1 ; Ser-His-Gly-Val-His

CDR-2 ; Val-Ile-Trp-Gly-Ala-Gly-Arg-Thr-Asp-Tyr-Asn-Ala-Ala-Phe-Ile-Ser

CDR-3 ; Asn- Arg-Tyr-Glu-Ser-Tyr-Phe-Asp-Tyr

L鎖可変領域のCDR-1、CDR-2及びCDR-3が次のアミノ酸配列である抗体をコードする核酸に関する。すなわち、本発明は、H鎖可変領域のCDR-1、CDR-2及びCDR-3が次のアミノ酸配列である抗体をコードする核酸に関する。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0044

【補正方法】変更

【補正内容】

【0044】

【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 351

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA,

起源

生物名: マウス

株名: anti-My-10

配列

```

CAG GTG CAG CTG AAG CAG TCA GGA CCT GGC CTA GTG CAG CCC TCA CAG   48
Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln
      5              10              15
AGC CTG TCC TTC ATC TGC ACA GTC TCT GGT TTC TCA TTA ACT AGT CAT   96
Ser Leu Ser Phe Ile Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser His
      20              25              30
GGT GTA CAC TGG GTT CGC CAG TCT CCA GGA AAG GGT CTG GAG TGG CTG  144
Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
      35              40              45
GGA GTG ATA TGG GGT GCT GGA AGG ACA GAC TAT AAT GCA GCT TTC ATA   192
Gly Val Ile Trp Gly Ala Gly Arg Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Ile
      50              55              60
TCC AGA CTG AGC ATC AGC AGG GAC ATT TCC AAG AGC CAA GTT TTC TTT   240
Ser Arg Leu Ser Ile Ser Arg Asp Ile Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe
      65              70              75              80
AAG ATG AAC AGT CTG CAA GTT GAT GAC ACA GCC ATA TAT TAC TGT GCC   288
Lys Met Asn Ser Leu Gln Val Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
      85              90              95
AGA AAT AGG TAC GAG AGC TAC TTT GAC TAC TGG GGC CAA GGC ACC ACT   336
Arg Asn Arg Tyr Glu Ser Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
      100             105             110
CTC ACA GTC TCC TCC
Leu Thr Val Ser Ser
      115

```

【手続補正書】

【提出日】平成9年4月7日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0046

【補正方法】変更

【補正内容】

【0046】配列番号: 3

配列の長さ: 879

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA

起源

生物名: マウス

株名: anti-My-10

配列

TTT TTT TTG CAG ATT TTC AAC GTG AAA AAA TTA TTA TTC GCA ATT CCT	48
Phe Phe Leu Glu Ile Phe Asn Val Lys Lys Leu Leu Phe Ala Ile Pro	
5 10 15	
TTA GTT GTT CCT TTC TAT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG GTG <u>CAG</u>	96
Leu Val Val Pro Phe Tyr Ala Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val <u>Gln</u>	
20 25 30	
CTG <u>AAG</u> <u>CAG</u> <u>TCA</u> GGA CCT GGC CTA GTG CAG CCC TCA CAG AGC CTG TCC	144
Leu <u>Lys</u> Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln Ser Leu Ser	
35 40 45	
TTC ATC TGC ACA GTC TCT GGT TTC TCA TTA ACT AGT CAT GGT GTA CAC	182
Phe Ile Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser His Gly Val His	
50 55 60	
TGG GTT CCG CAG TCT CCA GGA AAG GGT CTG GAG TCG CTG GGA CTG ATA	240
Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile	
65 70 75 80	
TGG GGT GCT GGA AGG ACA GAC TAT AAT GCA GCT TTC ATA TCC AGA CTG	288
Trp Gly Ala Gly Arg Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Ile Ser Arg Leu	
85 90 95	
AGC ATC AGC AGG GAC ATT TCC AAG AGC CAA GTT TTC TTT AAG ATG AAC	336
Ser Ile Ser Arg Asp Ile Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe Lys Met Asn	
100 105 110	
AGT CTG CAA GTT GAT GAC ACA GCC ATA TAT TAC TGT GCC AGA AAT AGG	384
Ser Leu Gln Val Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Arg	
115 120 125	

TAC GAG AGC TAC TTT GAC TAC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC 432
 Tyr Glu Ser Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
 130 135 140
 TCC TCA GGT GGA GGC GGT TCA GGC GGA GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA 480
 Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 145 150 155 160
 TCG GAC ATC GAG CTC ACT CAG TCT CCA CTC TCC CTG CCT GTC AGT CTT 528
 Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu
 165 170 175
 GGA GAT CAG GCC TCC ATC TCT TGC AGA TCT AGT CAG AAC CTT GTA CAC 576
 Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Leu Val His
 180 185 190
 AGT AAT GGA AAT ACC TAT TTA CAT TGG TAC CTG CAG AAG CCA GGC CAG 624
 Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
 195 200 205
 TCT CCA AAT CTC CTG ATC TAC AAA GTT TCC AAC CGA TTT TCT GGC GTC 672
 Ser Pro Asn Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val
 210 215 220
 CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGA TCA GGG ACA GAA TTC ACA CTC AAG 720
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Lys
 225 230 235 240
 ATC AGC AGA GTG GAG GCT GAG GAT CTG GGA GTT TAT TTC TGC TCT CAA 768
 Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln
 245 250 255
 AGT ACA CAT GTT CCG CTC ACG TTC GGT GCT GGG ACC AAG GTG GAG CTG 816
 Ser Thr His Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Val Glu Leu
 260 265 270
 AAA CGG GCG GCC GCA GGT GCG CCG GTG CCG TAT CCG GAT CCG CTG GAA 864
 Lys Arg Ala Ala Ala Gly Ala Pro Val Pro Tyr Pro Asp Pro Leu Glu
 275 280 285
 CCG CGT GCC GCA TAG 879
 Pro Arg Ala Ala *
 290

フロントページの続き

(51)Int. Cl. 6

C 1 2 P 21/02

識別記号

F I

C 1 2 P 21/02

C